IDENTIFICATION DES ENTÉROBACTÉRIES

PROTOCOLE TECHNIQUE

Il s'agit d'une méthode miniaturisée permettant la mise en oeuvre d'un nombre de tests supérieurs à celui d'une galerie classique. En effet, la galerie Micro CSB Entérobactéries comporte 16 cupules permettant de réaliser 16 tests biochimiques et de faire un diagnostic de genre ou d'espèce de la plupart des Entérobactéries.

PRINCIPE

Il consiste à ensemencer des plaques présentant des cupules qui renferment des substrats déshydratés destinés à la mise en évidence d'activités enzymatiques ou d'assimilation de substrats carbonés. Ces puits sont ensemencés avec un inoculum qui reconstitue le milieu. Après incubation, la lecture des réactions est effectuée directement (virage de l'indicateur coloré utilisé) ou après addition de réactifs de révélation. L'identification se fait à l'aide d'un tableau de lecture.

COMPOSITION DU COFFRET

Le coffret Micro CSB Entérobactéries est composé de :

- 25 galeries Micro CSB Entérobactéries
- 25 milieux MEVAG Entérobactéries
- 25 fiches de lecture
- 1 fiche technique

Matériel non fourni

- Réactif de Kovacs
- Huile de paraffine Perchlorure de fer officinal dilué au 1/3
- KOH 4 %
- Alpha-naphtol 6 %

CONSERVATION

Les microplaques se conservent à 2-8 °C. La date limite d'utilisation est imprimée sur l'emballage.

TEST DE PRE-IDENTIFICATION

Culture pure sur Muller-Hinton
Noter :
Aspect des colonies
EF, Gram
Oxydase , VF

Si :
Colonies de type “M “ ou “S“
Mobile ou immobile, Gram négatif
Oxydase négative, AAF,
Faire la Microgalerie d'identification

MODE D’EMPLOI

- Préparer une suspension bactérienne de turbidité égale à $7{,}65.10^6$ UFC dans 1,5 ml d'eau distillée avec quelques colonies d'une culture de 18-24 heures sur milieu solide.
- Distribuer 3 à 4 gouttes d'inoculum bactérien (remplissant la moitié de la cupule, environ 100μl) par cupule, de ADH à URE.
- Verser le reste de la suspension bactérienne dans 1 ml de MEVAG Entérobactéries et homogénéiser.
- Ensemencer les cupules de GLU à XYL avec le MEVAG ainsi inoculé (3 à 4 gouttes (environ 100μl) par cupule).
- Fermer les cupules LDC, ODC, ADH, URE et tous les sucres avec 2 gouttes d'huile de paraffine.
- Incuber à 37 °C sur un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau.
- Lire après 12-24 heures d'incubation.

Tél. +221 33 825 24 36 / +221 77 649 43 39 - Site web: www.microcsb.net - www.cismed-inov.org

ABG DES ENTÉROBACTÉRIES

PRINCIPE

- L'étude de la sensibilité aux antibiotiques va consister à ajouter au milieu (inoculum) deux concentrations critiques d'un antibiotique donné. Après une incubation de 18 à 24 heures, la croissance bactérienne est décelée grâce au virage de l'indicateur coloré (rouge de phénol).

PREPARATION DES SOLUTIONS D'ANTIBIOTIQUE

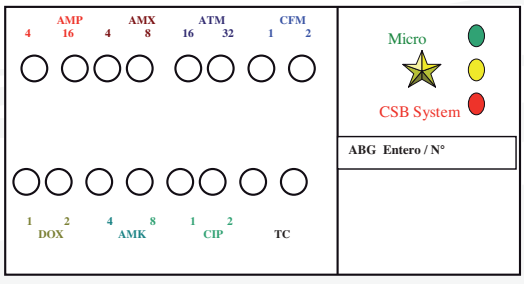
- Elle est basée sur la préparation d'une solution mère 200 fois plus concentrée que la concentration critique supérieure de l'antibiotique dans le solvant considéré.

- Pour la préparation, les masses à peser dépendent de l'activité des antibiotiques.

- La masse d'antibiotique requise est dissoute dans le volume exigé de solvant stérile pour obtenir la concentration de la solution mère qui est ensuite conditionnée en cryotubes et conservée à – 70°C, cette solution mère est 100 fois plus concentrée que la ST CCS. Il faut diluer donc la solution mère au 1/100ème pour obtenir les ST CCS et les ST CCI.

ST : solution de travail : diluer les SM au 1/100ème pour réaliser les concentrations des solutions de travail pour CCS et CCI.

100µl du double de la CCS des antibiotiques et 100µl de la CCI des antibiotiques donnés ont été respectivement distribuées dans les cupules supérieures (C) et inférieures (c) ou opposées (c) correspondantes selon un ordre bien établi.



PRÉPARATION DE L'INOCULUM

Il faut un bouillon MH supplémenté en Ca^{2+} et Mg^{2+}.

Préparer une suspension dans de l'eau distillée stérile, ajusté à une opacité équivalente à l'étalon 0,5 Mc FARLAND. Cette suspension a été diluée à 1/100ème.

INOCULATION DE LA PLAQUE

- 80µl de l'inoculum bactérien sont distribués dans chaque cupule.

- Recouvrir la plaque de papier adhésif et incuber pendant 18 à 24 heures sous papier buvard imbibé d'eau pour éviter la déshydratation du milieu.

LECTURE ET INTERPRETATION

L'interprétation se fera en fonction de la CMI de l'antibiotique.

Elle est encadrée par deux valeurs qui sont : la concentration critique supérieure (C) et la concentration critique inférieure (c).

Trois catégories cliniques ont été retenues

Les souches **S** : Les concentrations utilisées sont inférieures ou égales à la concentration critique inférieure (c).

Les souches **R** : Les concentrations utilisées sont supérieures à la concentration critique supérieure (C).

Les souches **I** : La CMI de l'antibiotique testé est comprise entre les deux concentrations critiques.

CMI	≤ c (mg/ml) CMI	> C (mg/ml) CMI
Souche sensible	Souche intermédiaire	Souche résistante

Tél. +221 33 825 24 36 / +221 77 649 43 39 - Site web: www.microcsb.net - www.cismed-inov.org

TABLEAU DE LECTURE

Tests	Substrats	Réactions / Enzymes	Réactifs à ajouter	Résultats Positifs	Résultats Négatifs
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase		Rouge	Jaune-Vert
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase		Rouge	Jaune-Vert
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase		Rouge	Jaune-Vert
URE	Urée	Uréase		Rose framboise	Orange
VP	Glucose + Pyruvate	Glucose + Pyruvate	1 goutte de KOH 1 goutte de créatinine 1 goutte de ß naphtol	Rose-Rouge	Incolore
GEL	Gélatine	Gélatinase		Diffusion du charbon	Inchangé
CS	Citrate de sodium	Utilisation du citrate		Bleu	Vert
CC	Citrate de sodium	Utilisation du citrate		Rose	Jaune clair
H2S	Thiosulfate de sodium	Production d'H2S		Noir	Incolore
IND	Tryptophane	Tryptophanase	1 goutte de Kovacs	Anneau rouge	Anneau incolore
MAL	Malonate de sodium	Utilisation du malonate		Bleu	Jaune vert
TDA	Phénylalanine	Phénylalanine désaminase	1 goutte de perchlorure de fer	Marron	Jaune
ONPG	ONPG	ß galactosidase		Jaune	Incolore
LAC	Lactose				
GLU	Glucose				
MAN	Mannitol				
XYL	Xylose				
XYL	Sorbitol	Fermentation		Jaune	Bleu

IDENTIFICATION DES PRINCIPALES ESPECES D'ENTEROBACTERIES